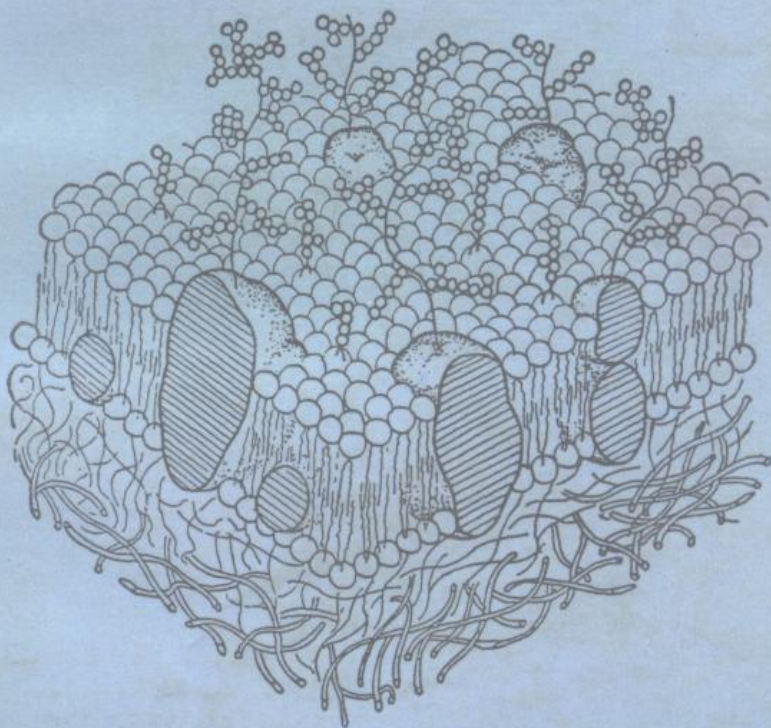


工业微生物

菌种选育与发酵控制技术

陈代杰 朱宝泉 编著

上海科学技术文献出版社



Q938.9
7.5

工业微生物 菌种选育与发酵控制技术

陈代杰 朱宝泉 编著

上海科学技术文献出版社

436004

(沪)新登字301号

工业微生物
菌种选育与发酵控制技术
陈代杰 朱宝泉 编著

*

上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路2号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销

上海市印刷十二厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 13.75 字数 333,000

1995年2月第1版 1995年2月第1次印刷

印数: 1—1,500

ISBN 7-5439-0552-3/Q·017

定价: 28.20元

《科技新书目》333-289

内 容 提 要

本书比较全面地从理论上和技术上阐述了如何获得优质高产微生物菌株和提供保证菌种发挥最大潜在生产能力的工艺过程。全书包括：绪论、工业微生物菌种选育和发酵控制的理论基础、自然选育、诱变育种、噬菌体的生物学特性及其抗噬菌体菌种的选育、微生物原生质体融合技术及其应用、微生物基因工程技术及其应用、用于工业微生物发酵的培养基、生产用种子的扩大培养、发酵过程的控制、工业发酵的灭菌及其染菌的防治等 11 章及常规微生物菌种选育实验、发酵工业中重要原料和有关参数的分析方法等附录。

本书可作为从事生物技术工业化研究、开发、生产者和管理人员的参考书，也可作为有关专业的大、中专学生的参考书。

前 言

尽管当今的生物技术具有高速拓展的势头，但作为工业微生物菌种选育和发酵控制这样一项既具有悠久历史，又不断被赋予崭新内容的应用性技术，依然是现代生物技术的一个重要的和必不可少的组成部分。可以相信，一个发酵工厂的成功与失败，很大程度上取决于这个工厂有无一株优质高产的菌株和一套与之相适应的工艺过程。如何获得一株优质高产的菌株和提供一套保证菌种发挥最大潜在生产能力的工艺过程，是本书将要从事理论上和技术上进行详细阐述的主要内容。

编写《工业微生物菌种选育和发酵控制技术》一书的直接因素有两个：一是近年来国内外已出了不少有关这方面内容的书籍和发表了许多具有实用价值的文章；二是作者在进行这方面科研工作的同时，有机会直接与不少发酵工厂的有关人员及大学有关专业的毕业班学生接触，发现有必要编写一本理论与实践密切结合的、且是通俗易懂的专业书，旨在希望能对从事这项工作的技术人员有所裨益。同时也希望对那些即将参加工作的有关专业的大、中专学生有所帮助。

本书在编写过程中，作者虽然参考了许多有关的国内外书籍及近期文献，并尽可能地结合自己的工作结果和体会，但限于水平，肯定存在错误和不足之处，谨请同行和读者批评指正。

在本书的出版过程中，得到安徽芜湖制药厂和鲁抗医药(集团)股份有限公司(原山东济宁抗生素厂)的支持，谨表谢意。

作 者

1994年3月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 工业微生物的发展概况.....	1
第二节 工业微生物的应用概况.....	7
一、氨基酸发酵	7
二、抗生素发酵	11
三、微生物酶制剂发酵	22
四、有机溶媒和有机酸发酵	29
五、核酸类发酵	30
六、微生物多糖和微生物脂肪发酵	32
七、微生物生物活性物质的发酵	35
八、食品发酵	42
九、单细胞蛋白	42
十、其他	44
第三节 发酵工业中重要的微生物菌种.....	47
第二章 工业微生物菌种选育和发酵控制的理论基础	67
第一节 微生物的遗传和变异.....	68
一、遗传的物质基础——DNA	68
二、遗传密码	73
三、遗传信息的转录与转译, RNA 和蛋白质的合成	76
四、遗传物质的存在形式	78
五、遗传变异	81
第二节 微生物的代谢.....	83
一、微生物的初级代谢	83

二、微生物的次级代谢	92
三、微生物初级代谢和次级代谢的关系	97
第三节 微生物的代谢调节	99
一、酶合成的调节	100
二、酶活性的调节	105
三、细胞膜透性的调节	108
第四节 微生物次级代谢的调节	109
一、参与抗生素生物合成调节的诱导物	110
二、抗生素产生菌的自身防卫机制	114
第五节 微生物代谢调节在工业发酵中的应用	117
一、消除微生物细胞的反馈调节	117
二、抗反馈调节突变株的菌种选育	118
三、改变微生物细胞膜通透性	120
第三章 自然选育	121
第一节 菌种退化变异的原因	121
一、遗传基因型的分离	121
二、自发变异的产生	122
三、经诱变剂处理后的退化变异	123
第二节 纯种筛选的选择性指标	124
一、排除低产型菌落	124
二、摇瓶筛选高产型菌株	125
三、遗传基因型纯度考查	126
四、传代稳定性试验	126
第四章 诱变育种	128
第一节 诱变处理	130
一、诱变剂的作用原理	131
二、抗生素作为诱变剂用于菌种选育	147
三、诱变处理过程中的几个有关问题	147
第二节 筛选方法	151

一、随机筛选	152
二、半理性化筛选	155
第五章 噬菌体的生物学特性以及抗噬菌体菌种的选育	179
第一节 噬菌体的生物学特性	182
一、大肠杆菌噬菌体 T ₄ 的结构模式	182
二、病毒的繁殖过程	182
第二节 烈性噬菌体、温和噬菌体、溶源性细菌 及其相互关系	186
一、烈性噬菌体	186
二、温和噬菌体和溶源性细菌	187
三、烈性噬菌体、温和噬菌体和溶源性细菌的关系	187
第三节 抗噬菌体菌种的选育	189
一、抗噬菌体菌种选育的一般流程	189
二、溶源性菌株的排除试验	190
三、微生物菌种对噬菌体产生抗性、溶源性和敏感性 的可能机制	190
第六章 微生物原生质体融合技术及其应用	193
第一节 微生物原生质体融合的方法	194
第二节 原生质体融合试验中可能发生的问题、 原因及解决办法	202
第三节 原生质体融合试验中常用的培养基和试剂	203
第四节 原生质体融合技术的应用	214
第七章 微生物基因工程技术及其应用	218
第一节 DNA 重组技术的基本过程	218
一、目的基因的准备	219
二、载体的选择	222
三、基因与载体的连接技术	229
四、转化	230
五、重组体的筛选和表达产物的鉴定	232

第二节 基因工程菌的不稳定性及其对策·····	233
第三节 微生物基因工程技术的应用·····	235
第八章 用于工业微生物发酵的培养基·····	242
第一节 培养基的成分及其功能·····	244
一、碳源及其主要功能·····	244
二、氮源及其主要功能·····	249
三、无机盐、微量元素及其主要功能·····	261
四、水及其主要功能·····	265
五、生长因素及其主要功能·····	266
六、前体及其主要功能·····	268
七、刺激剂或效应物及其主要功能·····	269
八、抑制剂及其主要功能·····	271
九、诱导物及其主要功能·····	271
第二节 培养基的类型及其功能·····	273
第三节 发酵工业用培养基配制的原则及其注意点·····	274
第四节 用于不同产物发酵的培养基简介·····	277
一、用于抗生素发酵的培养基·····	277
二、用于菌体生物转化的培养基·····	281
三、用于食品发酵的培养基·····	282
四、用于生产单细胞蛋白、有机溶媒和有机酸的培养基·····	283
五、用于生产其他发酵产物的培养基·····	284
第五节 影响培养基质量的因素·····	284
第九章 生产用种子的扩大培养·····	287
第一节 种子扩大培养的一般工艺流程·····	288
一、实验室种子制备·····	289
二、生产车间种子制备·····	295
第二节 几种常见微生物发酵时种子扩大培养的方法·····	297

一、酵母发酵时的种子扩大培养	297
二、细菌发酵时的种子扩大培养	298
三、真菌发酵时的种子扩大培养	299
四、链霉菌发酵时的种子扩大培养	301
第十章 发酵过程控制	302
第一节 可供发酵过程监测和控制的参数	303
第二节 满足工业发酵要求的发酵器	307
第三节 发酵过程的代谢变化规律及其控制	309
一、分批发酵	309
二、补料分批发酵	313
三、连续发酵	315
第四节 发酵过程中几个重要参数的影响及其控制	316
一、温度对发酵过程的影响及其控制	316
二、pH 值对发酵过程的影响及其控制	319
三、基质浓度对发酵过程的影响及其控制	321
四、溶解氧对发酵过程的影响及其控制	322
五、泡沫对发酵过程的影响及其控制	324
六、发酵终点的判断标准	326
第十一章 工业发酵的灭菌以及染菌的防治	328
第一节 灭菌的理论和技術	329
一、热灭菌的原理和方法	329
二、化学药剂灭菌的原理和方法	340
三、射线灭菌的原理和方法	344
四、介质过滤除菌的原理和方法	344
第二节 发酵染菌的原因分析以及防治措施	348
一、常见的种子带菌原因及其防治措施	351
二、设备及附件渗漏造成的染菌及其防治措施	352
三、培养基灭菌不彻底导致染菌及其防治措施	358
四、空气系统导致染菌及其防治措施	359

五、技术管理与防止发酵染菌	359
第三节 噬菌体污染及其防治措施	369
附录一 常规微生物菌种选育实验	363
实验一 微生物菌种的分离纯化	363
实验二 链霉菌孢子的预萌发	365
实验三 紫外线诱变处理	366
实验四 NTG 诱变处理	367
实验五 琼脂柱预筛选	368
实验六 用琼脂柱筛选去代谢调节的高产突变株	369
实验七 氨基酸营养缺陷型菌株的筛选	370
实验八 耐药菌株的选育	375
实验九 链霉菌原生质体的制备和再生	376
实验十 原生质体融合	379
实验十一 噬菌体的分离和测定	381
实验十二 抗噬菌体菌株的选育	383
实验十三 沙土管保藏菌种	385
实验十四 冷冻干燥保藏菌种	386
实验十五 石蜡油保藏菌种	388
实验十六 大(小)米保藏菌种	389
附录二 发酵工业中重要原副材料的分析和有关参数的测定	390
一、重要的原副材料的分析	390
二、发酵过程中有关生化参数的测定	419
主要参考文献	426

第一章 绪 论

第一节 工业微生物的发展概况

微生物被用于发酵生产有着悠久的历史。尽管大部分微生物工艺技术是本世纪才发展起来的，且人们对这些工艺过程的基本原理、反应步骤和物质变化等微观的和宏观的生化现象的准确认识和理解也只是近百年的事情，但是人类借助于微生物活动的产物来生活度日，却是很久以前的事情了。最早的酿酒发酵可追溯到公元前 10000 年，而在公元前 5000~6000 年，埃及人已能制造啤酒。在此期间，我国也有记载这类活动的历史。在医药方面，数千年前民间就有人用发霉的干酪、肉类和奶油等来治疗创伤和感染。回想起来，这种医疗效果无疑是其中的抗菌物质在起作用。这些就是人类对微生物尚未具有理性认识时所从事的古代工业微生物技术工作。

工业微生物经过漫长历史发展到今天这样的规模 和 水平，是人类逐步完善对微生物的理性认识和应用这些理性知识指导生产实践所得到的结果。而近代工业微生物的飞速发展主要是建立在如表 1-1 所列的几个领域得到重大突破的基础上的。

1680 年，荷兰科学家 Leeuwenhook 制成了能放大 200~800 倍的简单显微镜，首先观察到了啤酒发酵液中有酵母存在，并观察了污水、牙垢和腐败有机物等。他是第一个直接看到微小生物的科学家，并作了相当正确的描述，为微生物的存在提供了有力的证据，为以后微生物的研究创造了条件。但当时他把

表 1-1 近代工业微生物发展过程中的几次重大突破

年 份	主 要 内 容	主要发明(现)者或代表人物
1680 年	发明了显微镜,首先观察到啤酒发酵液中有酵母细胞	Leeuwenhock
1836~1837 年	证明酵母是活的生命体	Cagniard-Latour, Schwann 和 Kutzing
1856~1857 年	证明酒、醋的酿造过程是微生物发酵过程,并且认为不同的微生物引起不同的发酵;酒变酸是由有害微生物繁殖而引起的,因此提出了科学的消毒方法——巴斯德消毒法	Louis Pasteur
1870 年	观察到微生物的拮抗作用,并预计其治疗作用	Louis Pasteur
1881 年	发明了纯种培养技术	Robert Koch
1897 年	证明发酵是酶的作用,此为近代酶学基础	Edward Buchner
1928 年	发现青霉菌能抑制细菌生长,并证明青霉菌的培养液中含有抗菌物质	Fleming
1940 年	得到青霉素纯品,证明其疗效,并迅速实现工业化生产	Florey 和 Chain
1953 年	提出了脱氧核糖核酸分子双螺旋结构的模型和核酸半保留复制学说,使分子生物学得到迅速发展	Watson 和 Crick

显微镜里看到的生物画成图片送给皇家学会，没有受到应有的重视。一些化学家也全然不相信 Leeuwenhook 发现啤酒发酵液中存在酵母，所以啤酒发酵还是按照老方法进行。

1818 年，Erxleben 提出酵母可能是一种有生命的机体，它能引起发酵，但这种说法很少受到注意。到 1837 年，Oagninard Latour 的研究指明了葡萄酒酵母是一种有生命的机体。同年，Schwann 发表了类似的研究结果，并且进一步指明在每一次酒精发酵中酵母细胞必然存在，Kutzing 也指出醋酸的形成同样是由于生活机体造成的。但这些观点竟遭到当时一些著名化学家的嘲笑。

1847 年，一个名叫 Blondeau 的外科医生在研究乳酸、丁酸、乙酸和尿的发酵时，第一个提出了不同的“真菌”能够进行不同的发酵的观点。1856~1857 年，Louis Pasteur 在对啤酒发酵和葡萄酒发酵进行详细深入的研究后得出了当活酵母在专性厌氧条件下发酵时能够将糖转化为乙醇和二氧化碳的结论。在此期间，Pasteur 发现了发酵乳酸的细菌并研究了许多其他发酵，取得了一系列的成果。经过研究，他确认诸如酒精发酵、乳酸发酵和丁酸发酵等各种不同的发酵，是由不同的发酵菌所引起的。至此，建立了发酵的生命理论。同年，Pasteur 又通过实验证明，要把培养基中所含的生物体杀死，必须加热并需要一定的加热温度和加热时间，同时也提出了科学的消毒方法即 Pasteur 消毒法。从此，微生物工业不仅生产食品，而且还有目的地生产具有工业用途的初级代谢产物，如丙酮、丁醇、乙醇、柠檬酸、甘油以及面包酵母、食用酵母和饲料酵母等。

1870 年和以后几年，Pasteur 与其他几位科学家一起观察到一种微生物对另一种微生物具有拮抗作用，并预计这种拮抗作用能够应用于治疗疾病，为微生物药物的出现和发展指出了

方向。

在工业微生物和医学微生物发展史上的另一项重大突破是德国科学家 Robert Koch 首先提出了微生物纯种培养的理论,并首先发明了固体培养基。应用固体培养基分离培养细菌,得到了细菌的纯培养物。以后随着微生物的分离方法逐渐完善,新发现的微生物日益增多。

在继 Pasteur 提出微生物的拮抗作用具有潜在医疗价值观点的 50 多年里,人们对很多微生物的拮抗作用能否应用于治疗疾病作了许多尝试,但均未获得成功。1928 年,英国细菌学家 Alexander Fleming 偶尔发现,污染在金黄色葡萄球菌培养皿上的点状青霉能够抑制细菌的生长。当时他指出,能够抑制细菌生长的活性成分是一种由点状青霉产生的、被称之为青霉素的物质所致。但是,这个重要的发现限于当时的社会条件,没能及时地得到重视。直到第二次世界大战爆发以后,由于医疗的需要,Florey 和 Chain 等重新拾起了 Fleming 研究过的工作,继续研究点状青霉的拮抗原理。经过几年的努力,终于提纯了青霉素。1944 年底他们首次使用青霉素进行了治疗,结果令所有的人出乎意料。于是,在美国北方地区实验室的帮助下,于 1945 年前后实现了大规模生产。这一具有划时代意义的工作,为现代抗生素工业生产奠定了基础,且在这一工作鼓舞下,人们开始了广泛深入的抗生素研究和新抗生素的寻找,发现了很多具有临床应用价值、农业应用价值和畜牧业应用价值的抗生素。大规模抗生素工业的崛起,对微生物工业的发展十分重要,它不仅对很多微生物发酵工艺(包括大量微生物次级代谢产物的生产、化学合成中某些中间物的微生物合成,以及甾体化合物的转化等)的发展起到了先驱作用,同时抗生素的发酵生产还为现代发酵工业积累了丰富经验,建立了一整套的研究和生产

的方法。

50年代和60年代工业微生物的发展除了抗生素产品种不断增加,其主要发展是扩大微生物发酵的产品,如氨基酸发酵工业、核酸类发酵工业等的崛起和人们对石油微生物的研究和应用,展示了工业微生物的广阔前景。

1958年 Watson 和 Crick 总结了前人的实验结果,提出了脱氧核糖核酸分子双螺旋结构的模型和半保留复制的学说后,遗传学和分子生物学迅速发展,新技术、新理论不断出现。基因工程和细胞工程的发展使得按照人们的需要去改造和创造新生物类型成为可能。这使传统的工业微生物这一应用学科注入了新鲜血液。自1973年克隆得到第一个基因和1975年得到第一个细胞杂交瘤以来,在不到20年的时间内,已有许多基因工程菌进入工业化规模并已制造了不少基因工程菌产物,使工业微生物的领域不断拓宽,内容不断赋新,为古老的发酵工业再次飞跃提供了新的技术和方法。

如果从另一个侧面来看发酵工业的发展历史,则大致可以划分为五个阶段。

第一阶段是1900年以前的发酵工业。这一阶段仅限于酒精饮料和醋的生产。虽然在古埃及已经能酿造啤酒,但一直到17世纪才能在45 000加仑的木质大桶中进行第一次真正的大规模酿造。在早期的酿造中,也尝试过对酿造过程的控制。据历史记载,在1757年已应用温度计,在1801年就有了原始的热交换器。

第二阶段可以认为是1900年到1940年。这一阶段的主要新产品是酵母、甘油、柠檬酸、乳酸、丁醇和丙酮。其中面包酵母和有机溶剂的发酵有着十分重大的进展。分批补料培养技术首先被用于面包酵母的生产。面包酵母的生产是需氧过程,酵母

在丰富养料中快速生长而使培养液中的氧耗尽，致使菌体生长速度降低同时生成乙醇。限制营养物的初始浓度，使细胞生长宁可受到碳源的限制而不使受到缺氧的影响；然后在培养过程中加入少量的养料。这种分批补料培养技术已广泛应用于发酵工业，以防止出现缺氧现象和高浓度底物调节等现象。由 Weizmann 等开拓的丁醇丙酮发酵和建立的无杂菌发酵为以后真正的无杂菌需氧发酵过程奠定了基础。

第三阶段发酵工业的进展是按战时的需要，在纯种培养技术下，以深层培养生产青霉素为标志。青霉素工业化生产的成功标志着工业微生物进入了一个充满生气的时代。在这一时期，发酵技术有重大变化，致使目前使用的大多数抗生素得以在此时期实现工业化生产。同时，抗生素工业的崛起，推动了氨基酸、核酸类、酶和菌体转化等生产技术的发展。

60 年代初期，许多跨国公司决定研究生产微生物细胞，作为饲料蛋白质的来源，推动了发酵技术的进展。这一时期可视为发酵工业的第四个阶段。

发酵工业发展史中的第五个阶段，是以在体外完成微生物基因操作，即以基因工程技术在工业微生物中的应用开始的。基因工程不仅能在不相关的生物间转移基因，而且还可以很精确地对一个生物的基因进行交换。因而可以赋予微生物细胞具有生产高等生物细胞所产生的化合物的能力。由此形成新型的发酵过程，即基因工程菌的发酵。如胰岛素和干扰素的生产，使工业微生物所产生的化合物超出了原有微生物产物的范围。采用基因操作技术也可提高工业微生物常规产品的生产能力，因而确信它将会引起发酵工业的革命，并出现大量新的发酵过程。

• • •